



①⑨ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 44 05 249 A 1**

⑥ Int. Cl. 5:  
**G 01 N 33/53**  
C 07 K 15/06

⑳ Aktenzeichen: P 44 05 249.9  
㉑ Anmeldetag: 18. 2. 94  
㉒ Offenlegungstag: 25. 8. 94

**DE 44 05 249 A 1**

③⑩ Unionspriorität: ③② ③③ ③①  
23.02.93 FR 93 02067

⑦① Anmelder:  
Pasteur Sanofi Diagnostics, Marnes la Coquette, FR

⑦④ Vertreter:  
ter Meer, N., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Müller, F.,  
Dipl.-Ing., 81679 München; Steinmeister, H.,  
Dipl.-Ing.; Wiebusch, M., 33617 Bielefeld; Urner, P.,  
Dipl.-Phys. Ing.(grad.); Merkle, G., Dipl.-Ing. (FH),  
Pat.-Anwälte, 81679 München

⑦② Erfinder:  
Larue, Catherine, Montpellier, FR; Marquet,  
Pierre-Yves, Meyzieu, FR

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑥④ Stabilisierte Troponin-Zubereitung für Immunoassays und Verfahren zur Stabilisierung von Troponin für Immunoassays

⑥⑦ Die Erfindung betrifft eine stabilisierte Zubereitung von Troponin I oder T für Immunoassays, die aus einer wässrigen Lösung besteht, die Troponin I oder Troponin T, 1 bis 10 Moläquivalente Troponin C pro Moläquivalent Troponin I oder T und  $Mg^{++}$ - und/oder  $Ca^{++}$ -Ionen enthält, sowie ein Verfahren zur Stabilisierung einer Zubereitung von Troponin I oder T für Immunoassays, welches darin besteht, 1 bis 10 Moläquivalente Troponin C pro Moläquivalent Troponin I oder T zuzugeben.

**DE 44 05 249 A 1**

## DE 44 05 249 A1

1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine stabilisierte Zubereitung von Troponin, die als Vergleichsprobe bei Immunoassays verwendet werden kann, die darauf abzielen, Troponin im Blutserum oder Blutplasma zu bestimmen.

Es ist bekannt, daß Troponin ein in den Muskelfasern vorliegender Proteinkomplex ist, der aus drei Proteinen, den Troponinen C, I und T, besteht, der die Steuerung der Muskelkontraktion durch  $\text{Ca}^{2+}$  auslöst, eine Kontraktion, die sich durch die Wechselwirkung von Myosin und Aktin in den Muskelfasern ergibt.

Wenn der Muskel geschädigt ist, so der Herzmuskel im Fall eines Myokardinfarkts, oder ein Skelettmuskel bei langanhaltenden physischen Belastungen, erscheinen hierbei freigesetzte kontraktile Proteine mehr oder weniger schnell in dem Blutkreislauf.

Es wurde bereits die Bestimmung von Troponinen als vorbeugende Diagnose von Myokardinfarkten vorgeschlagen, sei es nun die Bestimmung von Troponin T in Circulation 83 (1991), 902—912 oder die von Troponin I in Am. Heart J. 110 (1987), 1333—44 und Molecular Immunology 29 (2) (1992), 271—278.

Jeder enzymatische Immunoassay oder jeder Radioimmunoassay, die in KrankheitsanalySELaboratorien durchgeführt werden, setzen im allgemeinen neben der Lieferung der für die Bestimmung notwendigen Reagenzien, d. h. markierte oder unmarkierte Antikörper, Zeichner (tracer) und Verdünnungslösungen, durch den Hersteller auch die Lieferung einer Eichlösung der zu probierenden Verbindung ein, die bei der Anwendung unter Bedingungen, die analog sind jenen der zu untersuchenden Probe, als Vergleichsmaßstab zur Berechnung der Ergebnisse und/oder als positive Kontrolle dient.

Es ist bekannt, daß Proteine in Lösung wenig stabil sind und daß sie enthaltende Reagenzien häufig in gefriergetrockneter Form vertrieben werden zusammen mit einem Lösungsmittel geeigneter Zusammensetzung, indem sie vor der Verwendung von dem Benutzer aufgelöst werden müssen. Wenn man die in dieser Weise erhaltenen Lösungen bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt, kann man sie während mehrerer Tage benutzen, selbst wenn die tägliche Bestimmung eine gewisse Veränderung der Konzentrationen des Reagens zeigt. So werden im allgemeinen — und es wird auch im Fall von Troponin T empfohlen — die ausgehend von dem gefriergetrockneten Material erhaltenen Vergleichslösungen in Einheitsdosisform eingefroren.

Wäßrige gepufferte Lösungen von Troponin, und insbesondere von Troponin I und T, können mehrere Monate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden. Es hat sich jedoch gezeigt, daß sie nicht mehr als einige Stunden bei  $+4^{\circ}\text{C}$  stabil sind, selbst wenn man Proteaseinhibitoren oder antibakterielle Mittel zusetzt, so daß es für die KrankheitsanalySELaboratorien erforderlich ist, ihre Eichlösungen häufig und in einigen Fällen zweimal täglich herzustellen.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht die Aufbewahrung von mehr oder weniger stark verdünnten Eichlösungen von Troponin I oder Troponin T, die bei spezifischen Immunoassays als Vergleichssubstanz dienen, während einiger Tage bei  $+4^{\circ}\text{C}$ .

Die stabilisierte Zubereitung der vorliegenden Erfindung umfaßt in wäßrigem Medium in Abhängigkeit von dem durchzuführenden Assay eines der beiden Troponine I oder T und 1 bis 10 Moläquivalente Troponin C und

2

vorzugsweise 2 bis 5 Äquivalente, sowie eine große Menge von  $\text{Mg}^{++}$ - und/oder  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen, insbesondere in Form von  $\text{CaCl}_2$ . Die  $\text{Mg}^{++}$ - und/oder  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen liegen in Form von Salzen vor, insbesondere des Chlorids, Bromids oder Nitrats. Die Menge der  $\text{Mg}^{++}$ - und/oder  $\text{Ca}^{++}$ -Salze, insbesondere von  $\text{CaCl}_2$ , kann dem 100- bis 10.000-fachen des Gewichts von Troponin I oder Troponin T entsprechen.

Das Troponin C kann menschlichen oder tierischen Ursprungs sein.

Die Konzentration von Troponin I oder T in den erfindungsgemäßen Lösungen entspricht jener, die im allgemeinen bei den Immunoassays angewandt wird, d. h., sie kann zwischen 0,01 ng/ml und 1 µg/ml und vorzugsweise zwischen 0,2 ng/ml und 25 ng/ml liegen, während die Konzentration der  $\text{Mg}^{++}$ - und/oder  $\text{Ca}^{++}$ -Salze, die nicht kritisch ist, zwischen 20 µM und 10 mM liegen kann; wobei diese Konzentration in klassischer Weise bei etwa 2 mM liegt.

Die Lösung kann in klassischer Weise auf einen pH-Wert zwischen 4 und 10, vorzugsweise zwischen 5,5 und 7,5, gepuffert werden und das Lösungsmittel kann teilweise oder vollständig aus normalem menschlichem Plasma bestehen, so daß es möglich wird, über eine Vergleichsprobe zu verfügen, die eine Zusammensetzung aufweist, die äquivalent ist der zu untersuchenden Probe, die das Plasma oder das Serum des Patienten enthält.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine pulverförmige Zubereitung von Troponin I oder T, vorzugsweise in gefriergetrockneter Form, die gegebenenfalls  $\text{Mg}^{++}$ - und/oder  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen, wie zum Beispiel  $\text{CaCl}_2$ , und 1 bis 10 Moläquivalente Troponin C umfaßt, wobei in diesem Fall die Anwesenheit von Troponin C nur dazu dient, die Stabilität der anderen Troponine zu dem Zeitpunkt sicherzustellen, da die Zubereitung von dem Benutzer in eine wäßrige Lösung überführt wird.

Wenn die gefriergetrocknete Zubereitung keine  $\text{Mg}^{++}$ - und/oder  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen enthält, müssen diese beim Inlösungbringen des Materials zugegeben werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Stabilisierung einer Lösung von Troponin I oder T für Immunoassays, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es darin besteht, 1 bis 10 Moläquivalente Troponin C pro Moläquivalent Troponin I oder T und  $\text{Mg}^{++}$ - und/oder  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen, beispielsweise  $\text{CaCl}_2$ , zuzugeben.

Im folgenden seien Beispiele der Ausführung der Erfindung und die Ergebnisse entsprechender Aufbewahrungsuntersuchungen angegeben.

Menschliches Troponin I (TnI) wurde nach der in FEBS Lett. 40 (1974), 253—257 beschriebenen Methode aus Herzen isoliert. Die erhaltene Lösung kann bei einer Konzentration oberhalb 10 µg/ml in einem Phosphatsalzpuffer, der 0,5% Kasein enthält, mehrere Monate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden.

Troponin T (TnT) kann nach der in J. Biochem. 72 (1972), 723—725 oder in J. Biol. Chem. 249 (1974), 4742—4748 beschriebenen Verfahrensweise erhalten werden.

Troponin C (TnC) kann nach der in Acta Chem. Scand. B 42 (1988), 211—215 beschriebenen Weise ausgehend von dem im Handel erhältlichen, aus Rindern gewonnenen Komplex der drei Troponine (T, C, I) gewonnen werden.

Die Konzentrationen der hergestellten Lösungen wurden mit Hilfe des Bradford-Reagens bestimmt, das in Ann. Biochem. 72 (1976), 248 beschrieben und im

## DE 44 05 249 A1

3

Handel erhältlich ist. Das Vergleichsprodukt ist eine bekannte Mischung aus Troponin I, C und T, die von der Firma Sigma in gefriergetrockneter Form unter der Bezugsziffer T 4895 vertrieben wird.

## Herstellung einer erfindungsgemäßen Zubereitung

— Zubereitung enthaltend 5 Mol Troponin C pro Mol Troponin I.

Man gibt zu 940 µl des Puffers  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1M; pH-Wert = 6,8), der 10% normales menschliches Plasma enthält, 276 µg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10 µl einer Lösung von Troponin I mit einer Konzentration von 10 µg/ml und 50 µl einer Lösung von Troponin C mit einer Konzentration von 10 µg/ml.

Vorzugsweise bewirkt man die Maßnahmen in sterilem Milieu unter Verwendung von sterilisierten Lösungen von Troponin I und Troponin C, beispielsweise indem man sie durch ein Filter mit einem Porendurchmesser von 0,22 µm führt.

Die erhaltene Lösung mit einer TnI-Konzentration von etwa 100 ng/ml und einer TnC-Konzentration von 500 ng/ml wird anschließend zur Herstellung einer Verdünnungsreihe von 1 ng/ml bis 10 ng/ml, bezogen auf Troponin I, verwendet.

— Man bereitet in gleicher Weise Lösungen, die 1 oder 2 oder 10 Moläquivalente Troponin C, bezogen auf Troponin I, enthalten.

Die pulverförmige Zubereitung kann durch Gefrier-trocknen einer in der obigen Weise hergestellten wäßrigen Zubereitung, aber ohne menschliches Plasma erhalten werden.

Man bereitet in analoger Weise Lösungen, welche 1 bis 10 Moläquivalente Troponin C, bezogen auf Troponin T, enthalten, indem man Troponin I durch Troponin T wechselt.

## Durchführung der Immunoassays

Man probiert die bei 4°C während 6 Wochen aufbewahrten Lösungen an den ausgewählten Tagen, wobei man als Vergleichsmaßstab eine Eichprobe verwendet, die man unmittelbar ausgehend von einer bei -80°C aufbewahrten Lösung von Troponin I hergestellt hat.

Das Assay erfolgt mit zwei monoklonalen Antikörpern, die gegen das Myokard-Troponin I gerichtet sind; wobei der erste Antikörper in den Wandungen von Reagenzgläsern für Immunoassays adsorbiert ist, die von der Firma NUNC (USA) unter der Bezeichnung Maxi-sorp, Startube, vertrieben werden; während der zweite Antikörper mit Peroxidase markiert ist. Die angewandte Methode ist die Sandwich-Methode.

Die Bildung der Antikörper ist in Molecular Immunology 29 (2) (1992), 271—278 beschrieben. Es hat sich gezeigt, daß sich bei diesem Assay keine Interferenz mit den anderen Isoformen von Troponin I, Troponin C oder anderen Myokard-Proteinen ergibt.

In Abwesenheit von TnC beobachtet man vom ersten Tag der Aufbewahrung an eine merkliche Verminderung der TnI-Konzentration bei allen Verdünnungen. Wenn TnC durch Actomyosin oder Tropomyosin ersetzt wird in einer Menge von 5 Moläquivalenten, bezogen auf TnI, so beträgt die nach Ablauf von 12 Tagen gemessene TnI-Konzentration nur noch 2/3 der Ausgangskonzentration von 10 ng/ml, während die mit TnC und  $\text{CaCl}_2$  stabilisierten Lösungen keine Veränderung zeigen.

Nach Ablauf von 40 Tagen zeigen die mit unter-

4

schiedlichen Konzentrationen von TnC und  $\text{CaCl}_2$  stabilisierten TnI-Lösungen keine Veränderung, während die nichtstabilisierten Lösungen eine scheinbare Konzentration zeigen, die auf bis zu 80% absinken kann.

## Patentansprüche

1. Stabilisierte Zubereitung von Troponin I oder Troponin T für Immunoassays, gekennzeichnet durch eine wäßrige Lösung, die Troponin I oder Troponin T, 1 bis 10 Moläquivalente Troponin C pro Moläquivalent Troponin I oder T und  $\text{Mg}^{++}$ - und/oder  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen enthält.
2. Zubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie Salze von  $\text{Mg}^{++}$  und/oder  $\text{Ca}^{++}$ , insbesondere  $\text{MgCl}_2$ , in einer Menge enthält, die dem 100- bis 10.000-fachen des Gewichts von Troponin I oder Troponin T entspricht.
3. Zubereitung nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie Troponin I und 2 bis 5 Moläquivalente Troponin C pro Moläquivalent Troponin I enthält.
4. Zubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie in wäßriger gepufferter Lösung mit einem pH-Wert zwischen 4 und 10 vorliegt.
5. Zubereitung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Lösungsmittel aus bis zu 100%-igem menschlichem Plasma gebildet ist.
6. Zubereitung nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Troponin I-Konzentration zwischen 0,01 ng/ml und 1 µg/ml und die Konzentration der Salze von  $\text{Mg}^{++}$  und/oder  $\text{Ca}^{++}$ , insbesondere von  $\text{MgCl}_2$ , zwischen 20 µM und 10 mM liegen.
7. Pulverförmige Zubereitung zur Herstellung einer stabilisierten Zubereitung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie Troponin I oder Troponin T, 1 bis 10 Moläquivalente Troponin C pro Moläquivalent Troponin I oder T und gegebenenfalls  $\text{Mg}^{++}$ - und/oder  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen enthält.
8. Zubereitung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie  $\text{CaCl}_2$  enthält.
9. Zubereitung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie in gefriergetrockneter Form vorliegt und frei von  $\text{Mg}^{++}$ - und/oder  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen ist.
10. Verfahren zur Stabilisierung einer wäßrigen Zubereitung von Troponin I oder T für Immunoassays, dadurch gekennzeichnet, daß es darin besteht, 1 bis 10 Moläquivalente Troponin C pro Moläquivalent Troponin I oder T und  $\text{Mg}^{++}$ - und/oder  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen zuzugeben.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es darin besteht, eine Menge von Salzen von  $\text{Mg}^{++}$  und/oder  $\text{Ca}^{++}$ , insbesondere in Form von  $\text{CaCl}_2$ , zuzugeben, die vorzugsweise dem 100- bis 10.000-fachen des Gewichts von Troponin I oder Troponin T entspricht.